



(51) 国際特許分類6 G01N 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO97/38309 (43) 国際公開日 1997年10月16日(16.10.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/01246 (22) 国際出願日 1997年4月10日(10.04.97) (30) 優先権データ 特願平8/88608 1996年4月10日(10.04.96) JP 特願平9/43331 1997年2月27日(27.02.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) エーザイ株式会社(EISAI CO., LTD.)(JP/JP) 〒112-88 東京都文京区小石川4丁目6番10号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 榊原俊平(SAKAKIBARA, Shunpei)(JP/JP) 〒565 大阪府吹田市藤白台2-23-3 Osaka, (JP) 木村皓俊(KIMURA, Terutoshi)(JP/JP) 〒662 兵庫県西宮市苦楽園二番町10-6 Hyogo, (JP) 森本茂人(MORIMOTO, Shigeto)(JP/JP) 〒547 大阪府大阪市平野区流町4丁目11番5号 インベリアルシャトー701号 Osaka, (JP)		(74) 代理人 弁理士 古谷 馨, 外(FURUYA, Kaoru et al.) 〒103 東京都中央区日本橋堀留町1-8-11 日本橋TMビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: ANTI-Glu ¹⁷ -OSTEOCALCIN ANTIBODY (54) 発明の名称 抗 Glu ¹⁷ -オステオカルシン抗体 <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;"> <p>Anti- [Glu¹⁷]- OC(10-22) Antibody</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">OC (logM) (◊ [Glu¹⁷]OC ◯ [Gla17]OC)</p>		
(57) Abstract An antibody capable of discriminating Glu ¹⁷ -osteocalcin from osteocalcin. An anti-Glu ¹⁷ -osteocalcin antibody or fragments thereof, characterized by being specifically bonded to Glu ¹⁷ -osteocalcin having a Glu residue at the 17-position or to osteocalcin fragments containing a Glu residue at the 17-position.		

(57) 要約

Glu¹⁷-オステオカルシンとオステオカルシンを識別することができる抗体を提供する。

オステオカルシンの17位がGlu残基であるGlu¹⁷-オステオカルシンもしくは17位Glu残基を含むオステオカルシンフラグメントと特異的に結合することを特徴とする抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。

参考情報

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	SG	シンガポール
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BA	ボスニア・エルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア共和国	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ		ラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
BR	ブラジル	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CA	カナダ	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MX	メキシコ	US	米国
CG	コンゴ	IT	イタリア	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ共和国	KR	韓国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		
		LK	スリランカ	SE	スウェーデン		

明 細 書

抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体

技術分野

本発明は低カルボキシル化オステオカルシン、特にGlu¹⁷-オステオカルシン（N端より17位にグルタミン酸[Glu]残基を有するオステオカルシンを意味する。以下同じ。）の検出や測定試薬として有効な、抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体、およびそれを用いた試料中のGlu¹⁷-オステオカルシンの測定方法に関する。

従来の技術：

〈発明の背景〉

退行期女性の骨量減少に関与する因子として、閉経後の血中女性ホルモンの減少、ビタミンD代謝の変化、カルシウム（Ca）摂取不足、運動不足、喫煙などが指摘されている（Aloia J, Cohn S, Vaswani AN, Yeh JK, Yen K, Ellis K. 1985 Risk factors for postmenopausal osteoporosis. Am J Med 1985;78:95-100.）。最近、骨折を併発した骨粗鬆症女性の血中ビタミンK₁およびK₂濃度が低下していること（Hart JP, Shearer MJ, Klenerman L, Catterall A, Reeve J, Sambrook PN, Dodds RA, Bitensky L, Chayen J. Electrochemical detection of depressed circulating levels of vitamin K₁ in osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab 1985;60:1268-1269.; Hodges SJ, Akesson K, Vergnaud P, Obrant K, Delmas PD. Circulating levels of vitamins K₁ and K₂ decreased in elderly women with hip fracture. J Bone Miner Res 1993;10:1241-45.）、ビタミンK₂の一種であるMK-4を投与することにより退行期女性の骨塩量が増加すること（Orimo H, Fujita T, Onomura T, Inoue T, Kushida K, Shiraki M., Clinical evaluation of Ea-0167 (menatetrenone) in the treatment of osteoporosis. Phase III double-blind multi-center comparative study with alfacalcidol. Clin Eval 1992;20:45-100.）が報告され、ビタミンK代謝もまた退行期女性の骨塩量減少に関与することが明らかとなった。

骨代謝に対するビタミンKの作用点に関しては各種の報告があるが、このうち

でも骨基質の非コラーゲン性タンパク質のうちの主要タンパク質であるオステオカルシン中のGlu残基の γ -カルボキシル化に対し、ビタミンKは必須であり (Price PA, Fraser JD, Metz VG. Molecular cloning of matrix Gla protein: Implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. Proc Natl Acad Sci USA, 1987;84:8335-8339.)、 γ -カルボキシルグルタミン酸残基 (γ -carboxyglutamic acid: Gla残基) はCaに対する強い親和性を有し、オステオカルシンはこの γ -カルボキシル化を受けて初めて骨の成分であるハイドロキシアパタイトへの結合能を発揮することが知られている (Ha uschka PV, Lian JB, Cole DE, et al. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent protein in bone. Physiol Rev, 1989;69:990-1047.)。さらに高齢者とくに骨折例では、流血中の低カルボキシル化 (または非カルボキシル化) オステオカルシン [1残基以上のGla残基がGlu残基となったもの] 量が増加することが報告されており (Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud P, Leclercq M, Delmas PD., Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone Gla protein) in elderly women. J Bone Miner Res. 1991;6:1211-16.)、退行期骨塩量減少に、ビタミンK作用不全による低カルボキシル化オステオカルシンの増加が関与することが示唆されている。

オステオカルシンは、Bone Gla Protein (BGP) 又はvitamin K-dependent calcium binding proteinとも呼ばれ、骨芽細胞によって生合成される49～50個のアミノ酸からなるタンパク質であり (分子量約6000; ヒト及びウシは49個、ラットは50個のアミノ酸からなる)、生体のCaの恒常性の維持に関与しているといわれている。

ヒトオステオカルシンは、配列番号4 (配列中XaaはGla残基を示す。以下配列番号の記載がある場合について同じ。) に記載されるアミノ酸配列を有し、その分子中に、N末端から数えて17位、21位及び24位の3つのGla残基を有する。このように3個のGla残基が存在するため、 $2^3 - 1 = 7$ 通りの低カルボキシル化オステオカルシンのvariant typeが存在する。

〈従来の技術〉

以上のように、骨代謝のマーカーとして、流血中の低カルボキシル化 (または

非カルボキシル化) オステオカルシンを測定することができれば、骨脆弱症や骨粗鬆症による骨折の危険度を判断するなどの上で有用である。

そのため、例えばハイドロキシアパタイトに対して正常 (カルボキシル化) オステオカルシンが親和性を持つことを利用し、これに吸着させた後、低カルボキシル化オステオカルシンを測定する方法 (Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud P, Leclercq M, Delmas PD., Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone Gla protein) in elderly women. J Bone Miner Res. 1991;6:1211-16.) などがとられている。

例えば、デルマスらは、JP-A-6-78788において、生体試料中の低カルボキシル化オステオカルシンの濃度を測定することにより、骨脆弱症や骨粗鬆症骨折の危険性の検査方法を開示しているが、この中の実施例で、ハイドロキシアパタイト吸着後に残ったオステオカルシンの濃度を抗体で測定している。

しかし、これらの従来技術はハイドロキシアパタイトに吸着しないオステオカルシンを間接的に測定する方法であり、低カルボキシル化オステオカルシンのみを直接測定する方法ではない。

JP-A-6-78788に開示されるような低カルボキシル化オステオカルシンに特異的なモノクローナル抗体及びモノクローナル抗体を使用した測定系の報告はあるが、17位、21位、24位のどの部位の非カルボキシル化オステオカルシンを測定しているかについての記述はなく、そのためにオステオカルシンの17位、21位、24位のどの部位の非カルボキシル化が各種骨疾患の病態あるいは生理的な骨代謝に重要であるかは明らかとなっていない。

以上の問題点を解決するために、本発明者らは抗低カルボキシル化オステオカルシン抗体について鋭意研究した結果、17位の γ -カルボキシル化グルタミン酸残基の非カルボキシル化が他の部位の非カルボキシル化に比し生理的な条件下で容易に起こることを明らかにし、低カルボキシル化オステオカルシンの7つのvariant typeの中でも、特に17位にGlu残基を有するオステオカルシンが低カルボキシル化オステオカルシンの本態として重要であることを示した (Nakao M, Nishiguchi Y, Nakata M, Kimura T, Sakakibara S. Synthesis of human osteocalcins: γ -carboxyglutamic acid at position 17 is essential for a

calcium-dependent conformational transition., Peptide Res 1994;7:171-174.)。このような知見の下、配列番号5記載のペプチド断片を抗原として得られた抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体が、Glu¹⁷-オステオカルシンとGla¹⁷-オステオカルシンに対し優れた選択結合性を有することを見だし、本発明を完成した。

発明の開示

すなわち本発明は、1)オステオカルシンの17位がGlu残基であるGlu¹⁷-オステオカルシンもしくは17位Glu残基を含むオステオカルシンフラグメントと特異的に結合することを特徴とする抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントであり、2)オステオカルシンの21位がGla残基であるGla²¹-オステオカルシンもしくは21位Gla残基を含むオステオカルシンフラグメントと特異的に結合することを特徴とする前記1)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントであり、3)配列番号1または2記載のペプチド断片と特異的に結合することを特徴とする前記1)または2)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント、詳細に述べれば、Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Arg Gla Val Cys Gla/Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro Val (配列番号1または2)のペプチド断片と特異的に結合することを特徴とする前記1)または2)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントであり、4)配列番号3または4記載のペプチド断片と結合しないことを特徴とする前記1)ないし3)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント、詳細に述べれば、Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Gla Pro Arg Arg Gla Val Cys Gla/Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro Val (配列番号3または4)のペプチド断片と結合しないことを特徴とする前記1)ないし3)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントであり、5)配列番号5記載のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントと特異的に結合する前記1)ないし4)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体

またはそのフラグメント、詳細に述べれば、Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Arg Gla Val (配列番号5) のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントと特異的に結合する前記1)ないし4)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントであり、6)配列番号5記載のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントと結合し、配列番号6記載のペプチド断片と結合しないことを特徴とする前記1)ないし5)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント、詳細に述べれば、Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Arg Gla Val (配列番号5) のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントと結合し、Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Gla Pro Arg Arg Gla Val (配列番号6) のペプチド断片と結合しないことを特徴とする前記1)ないし5)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントであり、7)配列番号5記載のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントを抗原として得られた前記1)ないし6)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント、詳細に述べれば、Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Arg Gla Val (配列番号5) のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントを抗原として得られた前記1)ないし6)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントであり、8)抗体がモノクローナル抗体である前記1)ないし7)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントであり、9)前記1)ないし8)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントを含有するGlu¹⁷-オステオカルシン検出試薬であり、10)Glu¹⁷-オステオカルシンを蛍光もしくは発光物質、酵素、またはラジオアイソトープで標識(ラベル)し、前記1)ないし8)記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントを用いて、競合法により検出することを特徴とする、試料中のGlu¹⁷-オステオカルシンの測定方法に関する。

発明の詳細な説明

以下本発明を詳細に説明する。

本発明は、Glu¹⁷-オステオカルシンに選択的に結合し、Gla¹⁷-オステオカルシ

ンとは結合しない抗体を提供するものである。

本発明抗体は、オステオカルシンのN端より17位にGlu残基を有するGlu¹⁷-オステオカルシンもしくは17位Glu残基を含むオステオカルシンフラグメントと特異的に結合する。

17位Glu残基を含むオステオカルシンフラグメントとは、17位Glu残基を含み、全体として6残基以上のアミノ酸を含むペプチドフラグメントであることが望ましい。より好ましくは21位のGla残基を含むペプチドフラグメントである。さらに、Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Arg Gla Val Cys Gla/Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro Val (配列番号1または2) のペプチド断片と結合性を有し、Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Gla Pro Arg Arg Gla Val Cys Gla/Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro Val (配列番号3または4) のペプチド断片と結合しないことが好ましい。

本発明にかかる抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、さらにはその反応性を有する限り、抗体のフラグメントであっても良い。

この抗体のフラグメントとは、Fc' あるいはFc領域を除去したF(ab')₂、Fab' あるいはFab画分、あるいはその重合体であってもよく、また、そのキメラ抗体であってもよい。

本発明抗体は、配列番号5記載のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントを抗原ペプチド(またはエピトープ)として用いることにより作成することができる。

ここで、配列番号5に記載されたペプチド断片(Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Arg Gla Val)とは、オステオカルシンの10位から22位にわたるペプチドフラグメントのうち、17位のGla残基がGlu残基に置換された13個のアミノ酸からなるポリペプチドである。

Glu残基を含むそのフラグメントとは、配列番号5記載のペプチド断片中、

Glu残基を含むその一部のフラグメントをいう。

また、エピトープとは構造既知の抗原決定基を意味し、タンパク質（ポリペプチド）においては、一般に少なくとも6個のアミノ酸で構成される（6個のアミノ酸で構成されるポリペプチドが抗体と結合することは特表昭60-500684号公報に開示されている）。そのため、本願における抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体の作成にあたっては、配列番号5記載のペプチド断片をエピトープとして用いるだけでなく、Glu残基を含むそのフラグメントをエピトープとして調製することも可能であり、好ましくは少なくとも6以上の連続したペプチド断片が選択される。

即ち、本発明の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体は、Glu残基を含むそのフラグメントが、少なくとも6個以上の連続したペプチド断片からなるフラグメントをエピトープとして調製することもできる。

このように調製された抗体の中から、特に好ましくは配列番号3または4記載のペプチド断片（Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Gla Pro Arg Arg Gla Val Cys Gla/Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro Val）および／または配列番号6記載のペプチド断片（Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Gla Pro Arg Arg Gla Val）と結合しないものが選択される。

本発明にかかる抗体は、低カルボキシル化オステオカルシン検出用試薬、特にGlu¹⁷-オステオカルシンの検出に利用することができ、近年問題となっている骨脆弱症や骨粗鬆症による骨折の危険性の判断にも有用である。

本発明にかかるGlu¹⁷-オステオカルシンの検出試薬は、本発明抗体を含むことにより調製することができ、例えば標準抗原、抗原希釈用溶液、発色剤、基質溶解液、洗浄液、反応停止液などの他、一般に検出試薬の原料として用いられる成分を配合して目的とするキットとすることができる。

血液、血漿、血清、尿などの試料中のGlu¹⁷-オステオカルシン量を測定するには、蛍光もしくは発光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、または¹²⁵Iなどのラジオアイソトープで標識（ラベル）したGlu¹⁷-オステオカルシンを、試料中の抗原と本発明抗体に対して競合させることにより、試料中のGlu¹⁷-オステオカルシンを測定することができる。

本発明抗体は、以上のような性質を有するものであるが、その中でも特に好ましい抗体を挙げると、1)Glu¹⁷-オステオカルシンに特異的に結合する、2)Glu¹⁷, Gla²¹-オステオカルシンに特異的に結合する、3)配列番号1または2記載のペプチド断片と特異的に結合し、配列番号3または4記載のペプチド断片と結合しない、4)配列番号5記載のペプチド断片と特異的に結合し、配列番号6記載のペプチド断片と結合しない、または5)[配列番号1または2]および[配列番号5]記載のペプチド断片と特異的に結合し、[配列番号3または4]および[配列番号6]記載のペプチド断片と結合しないなどの性質を有する抗体が挙げられる。

したがってこれらの性質を有する抗体を使用すれば、17位にGlu残基を有する4つの低カルボキシル化オステオカルシンのvariant typeを識別することができ、さらに、その中で17位にGlu残基および21位にGla残基を有する2つの低カルボキシル化オステオカルシンのvariant type (17位Glu残基、21位Gla残基、24位GlaまたはGlu残基)を識別することが可能となる。

発明の実施の形態：

本発明抗体の調製は配列番号5記載のGlu¹⁷-オステオカルシンのペプチドフラグメントを抗原とし、必要に応じてキャリアタンパク質 (B S A [bovine serum albumin]やO V A [ovalbumin]など)との複合体を作り、これを動物に接種して免疫する。また、Tam JPによって開発されたMAP系 (Multiple antigen peptide system) を使用して免疫することもできる (Tam JP, Synthetic Peptide : Approaches to Biological Problems, p3-18, 1989; Tam JP, PNAS USA, 85, 5409, 1988; Tam et al., J. Exp. Med., 171, 299, 1990; Tam and Lu., PNAS USA, 86, 9084, 1989)。上記免疫動物の脾臓あるいはリンパ節から得られた抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合し、配列番号5記載のペプチド断片および低カルボキシル化オステオカルシン (Glu¹⁷-オステオカルシン) に強い特異性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選択することにより調製される。その操作は従来既知の方法に準ずればよい。

免疫抗原としては天然もしくはワーファリンによって誘発されたGlu¹⁷-オステオカルシンのフラグメント、遺伝子組換え手法により得られたGlu¹⁷-オステオカルシンのフラグメント、天然もしくは遺伝子組換えによりえられたオステオカルシ

ンを熱的もしくは化学的に脱カルボキシル化の操作をしたもののフラグメント、または化学合成手法により生産したものなどいずれも使用できる。

しかし、天然物のGlu¹⁷-オステオカルシンを免疫用抗原とするために分離・精製することは、その生体試料中濃度がとても低いことから実用的ではない（例えば血中の含量はpg/mlのオーダーであり、免疫に供する量を確保するには数トンの血液が必要である）。もし大量に試料を使うことができるのであれば、公知の分離・精製法を適宜組み合わせて実施することができる。これらの公知の方法としては塩析、溶媒沈殿法、透析ゲルろ過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィーなどが挙げられる。

従って実用的には、免疫抗原用Glu¹⁷-オステオカルシンのフラグメントペプチドの調製は化学合成法、上記遺伝子組換え法あるいは天然物を分解する方法などが用いられるが、簡便には、常法によりペプチドシンセサイザーを用いて行うことができる。

抗原とキャリアタンパク質の複合体の調製は種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、マレイミド活性エステル等が使用できる。

キャリアタンパク質は牛血清アルブミン、サイログロブリン、ヘモシアニン等の常用されているものでよく、通常1～5倍量の割合でカップリングさせる方法が用いられる。

免疫される動物としてはマウス、ラット、ウサギ、モルモットなどがあげられ、接種方法は皮下、筋肉あるいは腹腔内に投与される。投与に際しては完全フロイントアジュバンド（FCA : Freund's complete adjuvant）や不完全フロイントアジュバンド（FIA : Freund's incomplete adjuvant）と混和して投与してもよく、投与は通常2～5週毎に1回ずつ行われる。免疫された動物より血液を採取し、血清を分離し、血清より抗体を硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなど常用されている方法で精製してポリクローナル抗体とする。また、免疫された動物の脾臓あるいはリンパ節から得られた抗体産生細胞は骨髓腫細胞と細胞融合させられハイブリドーマとして単離される。

骨髓腫細胞としてはマウス、ラット、ヒト等由来のものが使用され、抗体産生細胞と同種由来のものであることが好ましいが、異種間においても可能な場合もある。

細胞融合の操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法

(Nature, 256, 495, 1975) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコールやセンダイウイルスなどが挙げられるが、通常20～50%程度の濃度のポリエチレングリコール（平均分子量1000～4000）を用いて20～40℃、好ましくは30～37℃の温度下、抗体産生細胞数と骨髓腫細胞数の比は通常1 : 1～10 : 1程度、約1～10分間程度反応させることにより細胞融合を実施することができる。抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の免疫化学的方法が使用できる。たとえば、Glu¹⁷-オステオカルシンをコートしたマイクロプレートを用いるELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法、抗免疫グロブリン抗体をコートしたマイクロプレートを用いるEIA (enzyme immunoassay) 法、Glu¹⁷-オステオカルシンを含むサンプルを電気泳動後ニトロセルロース転写膜を用いるウェスタンブロット法などがあげられる。

このようなウエルから更に例えば限界希釈法によってクローニングを行いクローンを得る。ハイブリドーマの選別、育種は通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加して、10～20%牛胎児血清を含む動物細胞用培地（例、RPMI 1640）で行われる。このようにして得られたクローンはあらかじめプリスタンを投与したBALB/Cマウスの腹腔内へ移植し、10～14日後にモノクローナル抗体を高濃度に含む腹水を採取し、抗体精製の原料とすることができる。また、該クローンを培養し、その培養物を抗体精製の原料とすることもできる。モノクローナル抗体の回収は免疫グロブリンの精製法として既知の方法を用いればよく、たとえば、硫酸分画法、PEG分画法、エタノール分画法、陰イオン交換体の利用、さらにアフィニティクロマトグラフィなどの手段により容易に達成することができる。

本発明によって得られた抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体を用いる免疫学的方法により生体試料中のGlu¹⁷-オステオカルシン（正常オステオカルシンが有する17位のGla残基が脱カルボキシル化してGlu残基になったものや、ビタミンKの代謝

異常等により生じたオステオカルシンの17位のP I V K A体(Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonist)などの17位非カルボキシル化オステオカルシンなどが含まれる)の定性、定量を行うことができる。

免疫学的方法としては、生体試料を必要に応じて適切に処理、たとえば血液、血漿、血清、尿などを試料とすることができる。また、細胞の分離、抽出操作などした試料についても試料とすることができる。これらの試料について、免疫組織染色法、E L I S A法やR I A (radioimmunoassay) 法などの免疫測定法、凝集法、競合法、サンドイッチ法など既知の方法を適用することができる。免疫組織染色法あるいは免疫測定法は、例えば標識化抗体を用いる直接法、該抗体に対する抗体の標識化されたものを用いる間接法などにより行いうる。標識化剤としては蛍光物質・発光物質、放射性物質、酵素、金属、色素など公知の標識物質はいずれも使用できる。

図面の簡単な説明：

図1は、抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体を用いたGlu¹⁷-オステオカルシンのラジオイムノアッセイの標準曲線の緩衝液中カルシウム濃度依存性を示す図である。標準物質としてはGlu¹⁷-オステオカルシン(1-49)「○」(丸)あるいはGla¹⁷-オステオカルシン(1-49)「◇」(四角)を用いた。

図2は、健常女性322例における血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度の加齢変化を示す図である。

図3は、健常女性322例における血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と腰椎骨塩量Z scoreの相関を示す図である。

図4は、各年代女性における血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と腰椎骨塩量の絶対値との相関を示す図である。

実施例

以下の実施例により本発明を詳細に且つ具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例1. 抗原ペプチドの合成

抗原とする配列番号5記載のペプチドを米国Applied Biosystems社製のペプチド自動合成機で合成した。合成法としては、高分子樹脂担体を用いる固相合成法によりC端より逐次合成を行い、相当する保護ペプチド樹脂を合成した。保護ペプチド樹脂から酸処理にて目的とする粗ペプチドは逆相高速液体クロマトグラフィーで精製を行い目的とする抗原用のペプチドを得た。

このペプチドは、Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Arg Gla Valの13残基で、正常なオステオカルシンの10位から22位にわたるペプチドフラグメントのうち、17位のGla残基がGlu残基に置換されたものである。N末端にコンジュゲーションのためにシステイン残基を付加した。

実施例2. 抗体の調製

このように合成したペプチドをBSA、OVAなどに結合させて高分子とし、これを免疫原としてマウスに免疫した。具体的には、前記のペプチド断片を、まず0日目に免疫前血清の力価測定用血液をサンプリングした後、マウス(BALB/C)2匹にFCAとエマルジョンを作り、50 μ g/匹を腹腔に2~3ヶ月間定期的に投与して免疫した。

その後脾臓細胞を採取し、Myeloma細胞P3U1と融合した。これを培養し、HAT培地で選択した。このうち、配列番号5に記載のペプチド断片および配列番号1または2記載の低カルボキシル化オステオカルシン(Glu¹⁷-オステオカルシン)と反応し、配列番号3または4記載のオステオカルシンおよび配列番号6に記載のペプチド断片と反応しない融合細胞をクローニングした。IgGを分泌する細胞のみを選択し、培養上清中のIgGをprotein Aまたはprotein Gで精製して精製モノクローナル抗体を得た。

実施例3. 力価検定など

抗体の性質や力価の検定はELISA法で検討した。

ELISAは、マイクロプレート(住友ベークライト社製;Hタイプ、Aタイプ)を用い、まず、抗原ペプチドをコーティングした。カゼイン溶液でブロッキングした後、培養上清あるいは精製モノクローナル抗体を適当に段階的に希釈して加え、固相上で抗原抗体反応を行わせて、免疫複合体を形成させ、さらに酵素標識第2抗体(抗マウスIgG抗体)を反応させた。洗浄後、固相上に結合した

酵素活性を測定することで抗体の産生の有無、力価変動、特異性を検討した。

ここで得られた抗体は、配列番号 5 記載のペプチドとは反応したが、配列番号 6 記載のペプチドとは交差反応を示さなかった。

実施例 4. Glu¹⁷-オステオカルシンのラジオイムノアッセイ

Glu¹⁷-オステオカルシンを酵素法にて¹²⁵Iで標識し標識物質とした後、Glu¹⁷-オステオカルシンのラジオイムノアッセイを、抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体、標準物質としてGlu¹⁷-オステオカルシン(1-49)あるいはGla¹⁷-オステオカルシン(1-49)を用い、さらに0.5%ウシ血清アルブミン、5 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.4)を緩衝液として用いることにより行った。

また各ラジオイムノアッセイ系における緩衝液中カルシウム濃度依存性を検討するため、塩化カルシウムを0.03~10 mM の濃度にて添加した。さらに緩衝液中カルシウム濃度 0 mM の条件にはEGTA 1 mM を添加した。B/F 分離は二抗体法にて行った。

ラジオイムノアッセイ系におけるGlu¹⁷-オステオカルシン(1-49)およびGla¹⁷-オステオカルシン(1-49)の標準曲線の緩衝液中カルシウム濃度依存性を検討した結果を図 1 に示す。

いずれのラジオイムノアッセイ系においても各 2 種の標準曲線は緩衝液中カルシウム濃度依存性を示した。抗体として実施例 2 で得られた抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体を用いたラジオイムノアッセイ系では緩衝液中カルシウム濃度が 0 mM あるいは0.03 mM のときに標準物質Glu¹⁷-オステオカルシン(1-49)では良好な標準曲線が得られた。さらに、同抗体はGla¹⁷-オステオカルシン(1-49)を高濃度まで認識せず、Glu¹⁷-オステオカルシン(1-49)とGla¹⁷-オステオカルシン(1-49)を分離識別することが可能であった。

実施例 5. ヒト血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度の測定

ヒト血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度のラジオイムノアッセイに、抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体を用い、測定緩衝液としては0.5%ウシ血清アルブミン、1 mM EGTA、5 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.4)を用いた。

いずれの血漿の希釈曲線もGlu¹⁷-オステオカルシン(1-49)の標準曲線と良好な平行関係を示した。

この結果よりヒト血中にもGlu¹⁷-オステオカルシン免疫活性が存在することを示すとともに、ヒトの体内におけるGlu¹⁷-オステオカルシンの測定に本ラジオイムノアッセイ系が有効であることが示された。

以下のヒト血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度測定時には全ての血漿検体につき希釈曲線を作成し標準曲線の上下端20%に入る測定値は除外し、標準曲線の中央80%に位置する希釈の血漿検体の値のみを採用した。

実施例6. 女性における血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度の加齢変化

健常女性322例における血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度の平均値の加齢変化を図2に示した。

肥満度BMI (body mass index) が正常範囲 (18~26) を示す健常かつ歩行可能な16歳~93歳の女性322例を対象とし、早朝空腹時にEGTAチューブに採血し直ちに血漿を分離したものを、-20℃にて保存した後測定に供した。

血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度は加齢とともに上昇し、特に閉経前後および高齢者での上昇率が高いことが窺えた。この血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度の加齢による上昇はPlantalechらの報告 (Plantalech L, Guillaumont M, Vergnaud P, Leclercq M, Delmas PD., Impairment of gamma carboxylation of circulating osteocalcin (bone Gla protein) in elderly women. J Bone Miner Res. 1991;6:1211-16.) と類似するものである。

実施例7. 健常女性における血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と腰椎骨塩量との関係

女性における血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と、二重X線吸収骨量測定 (Lunar社製DPXを使用) にて測定した第二~第四腰椎骨塩量との相関を検討した。

その結果として、対象とした全322例の女性の血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と、各年齢における日本人の腰椎骨塩量の平均値を0とし標準偏差を1として各個人の骨塩量が各年齢の日本人平均値よりどのくらい解離しているかを示す値であるZ score との相関を図3に示した。全女性においては血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度が高値を示す例ほどこの腰椎骨塩量 Z score は低下しており、両値の間には $p < 0.001$ の負の相関関係を認めた。

さらに、図4にはこれらの女性を16歳~29歳の若年群、30歳~49歳の壮年群、

50～69歳の閉経後群、70～93歳の高齢群の4群に分け、それぞれの年代での血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と腰椎骨塩量の絶対値との相関を検討した結果を示す。各年代群の中では50歳～69歳の閉経後群において血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と腰椎骨塩量絶対値との間に負の相関を認めた。

上記のように、健常女性の血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と腰椎骨塩量Z scoreの間に $p < 0.001$ の有意の負の相関関係を認め、全年齢を通じて年齢相応よりも骨塩量が低下している例において血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度は高値を呈することが示された。また女性における年代別での血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と腰椎骨塩量の絶対値との相関の検討では各50歳～69歳の閉経後群において血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度と腰椎骨塩量絶対値との間に負の相関を認め、この時期の女性の著しい骨量減少、すなわち閉経後骨粗鬆症に血漿Glu¹⁷-オステオカルシン濃度高値が関与することが推察された。今回の検討においては健常女性を対象としたが、罹患頻度が極めて高い骨粗鬆症以外にも、多種の骨疾患における低カルボキシル化オステオカルシンの病態生理的意義の解明およびビタミンK作用の解明に本測定系が有用であると考えられる。

以上のように、本発明抗体を用いることにより、Glu¹⁷-オステオカルシンを容易に検出・測定することができ、それが関連する骨疾患の診断などに非常に有用である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 49

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : ヒト

配列の記述

Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
 1 5 10 15
 Glu Pro Arg Arg Xaa Val Cys Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu
 20 25 30
 Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro
 35 40 45
 Val

配列番号 : 2

配列の長さ : 49

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : ヒト

配列の記述

Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
 1 5 10 15
 Glu Pro Arg Arg Xaa Val Cys Xaa Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu

20 25 30
 Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro
 35 40 45
 Val

配列番号 : 3

配列の長さ : 49

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : ヒト

配列の記述

Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
 1 5 10 15
 Xaa Pro Arg Arg Xaa Val Cys Glu Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu
 20 25 30
 Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro
 35 40 45
 Val

配列番号 : 4

配列の長さ : 49

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : ヒト

配列の記述

Tyr Leu Tyr Gln Trp Leu Gly Ala Pro Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu
 1 5 10 15
 Xaa Pro Arg Arg Xaa Val Cys Xaa Leu Asn Pro Asp Cys Asp Glu Leu
 20 25 30
 Ala Asp His Ile Gly Phe Gln Glu Ala Tyr Arg Arg Phe Tyr Gly Pro
 35 40 45
 Val

配列番号 : 5

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : ヒト

配列の記述

Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Arg Xaa Val

1 5 10

配列番号 : 6

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : ヒト

配列の記述

Val Pro Tyr Pro Asp Pro Leu Xaa Pro Arg Arg Xaa Val

1 5 10

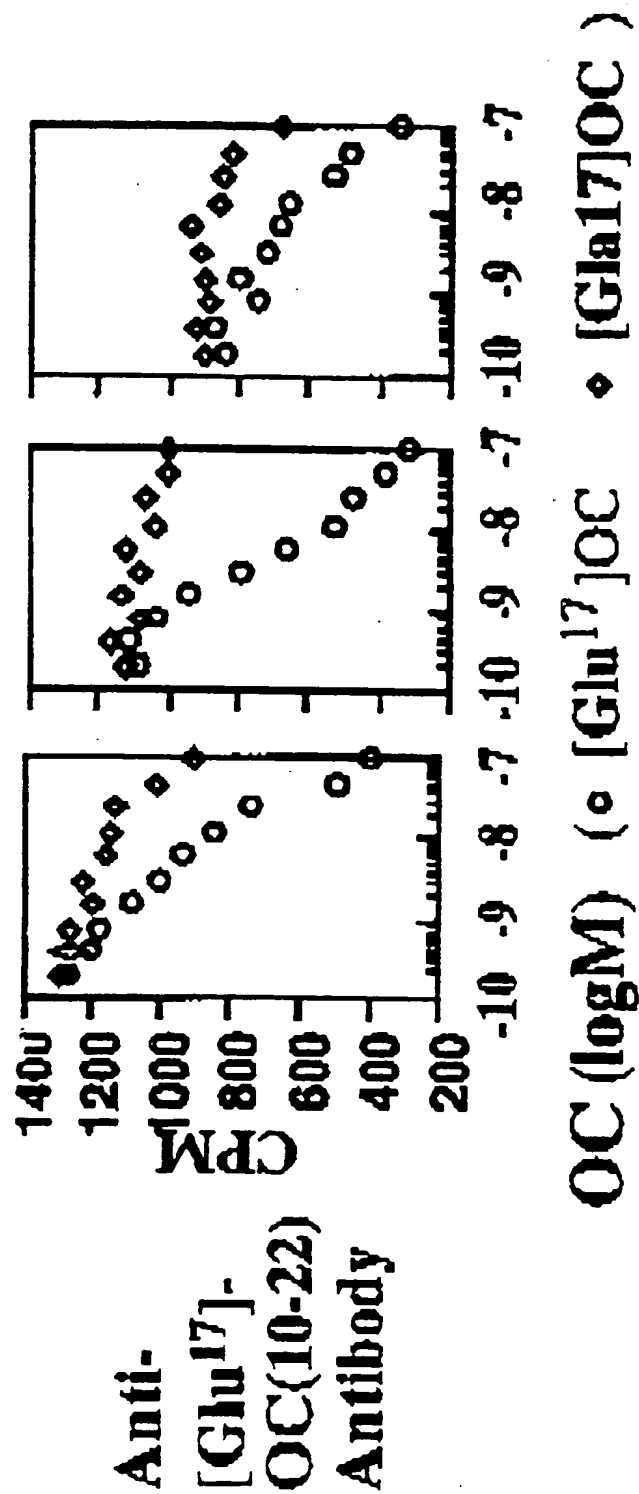
請求の範囲

1. オステオカルシンの17位がGlu残基であるGlu¹⁷-オステオカルシンもしくは17位Glu残基を含むオステオカルシンフラグメントと特異的に結合することを特徴とする抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。
2. オステオカルシンの21位がGla残基であるGla²¹-オステオカルシンもしくは21位Gla残基を含むオステオカルシンフラグメントと特異的に結合することを特徴とする請求項1記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。
3. 配列番号1または2（配列中XaaはGla残基を示す）記載のペプチド断片と特異的に結合することを特徴とする請求項1または2記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。
4. 配列番号3または4（配列中XaaはGla残基を示す）記載のペプチド断片と結合しないことを特徴とする請求項1ないし3記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。
5. 配列番号5（配列中XaaはGla残基を示す）記載のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントと特異的に結合する請求項1ないし4記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。
6. 配列番号5（配列中XaaはGla残基を示す）記載のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントと結合し、配列番号6（配列中XaaはGla残基を示す）記載のペプチド断片と結合しないことを特徴とする請求項1ないし5記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。
7. 配列番号5（配列中XaaはGla残基を示す）記載のペプチド断片もしくはGlu残基を含むそのフラグメントを抗原として得られた請求項1ないし6記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。
8. 抗体がモノクローナル抗体である請求項1ないし7記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。
9. 請求項1ないし8記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントを含有するGlu¹⁷-オステオカルシン検出試薬。
10. Glu¹⁷-オステオカルシンを蛍光もしくは発光物質、酵素、またはラジオ

アイントープで標識し、請求項 1 ないし 8 記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメントを用いて、競合法により検出することを特徴とする、試料中のGlu¹⁷-オステオカルシンの測定方法。

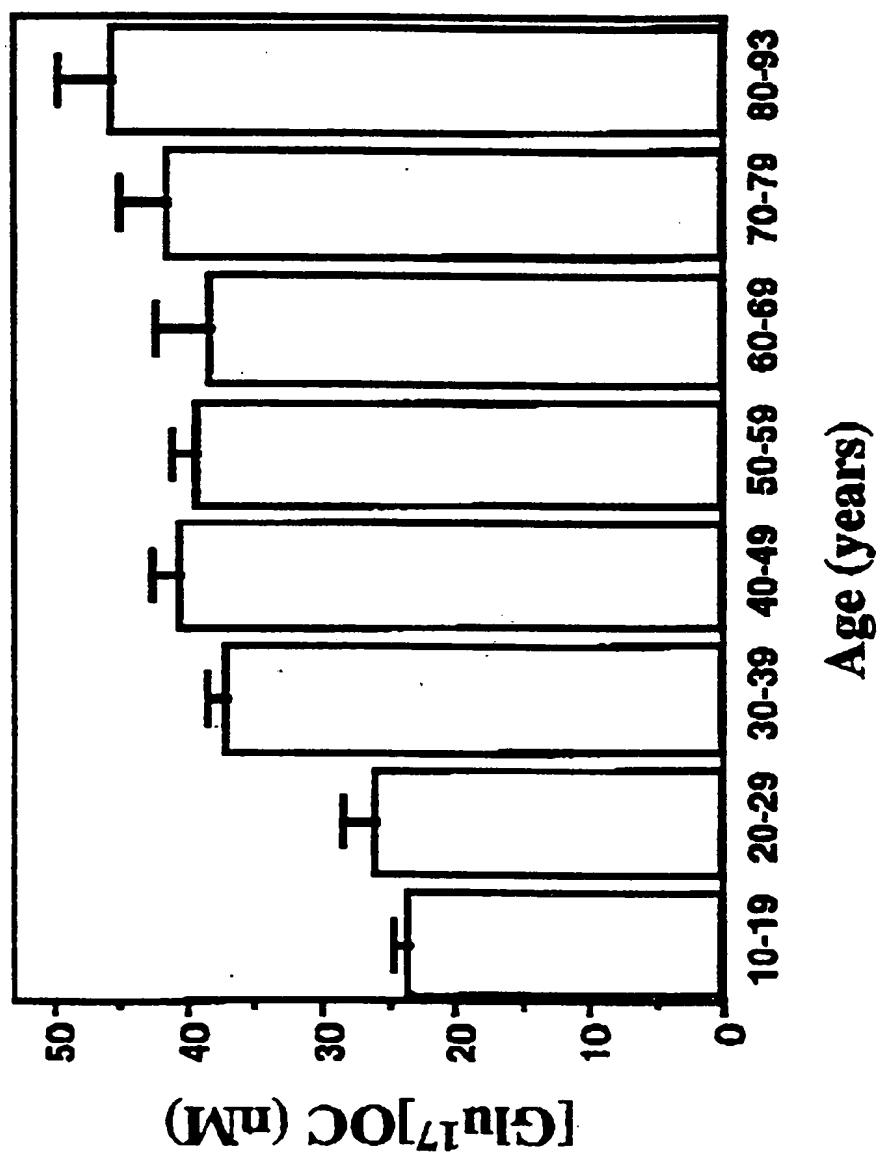
11. Glu残基を含むそのフラグメントが、少なくとも6個以上の連続したペプチド断片からなるフラグメントである請求項 1～7のいずれか一項に記載の抗Glu¹⁷-オステオカルシン抗体またはそのフラグメント。

図 1



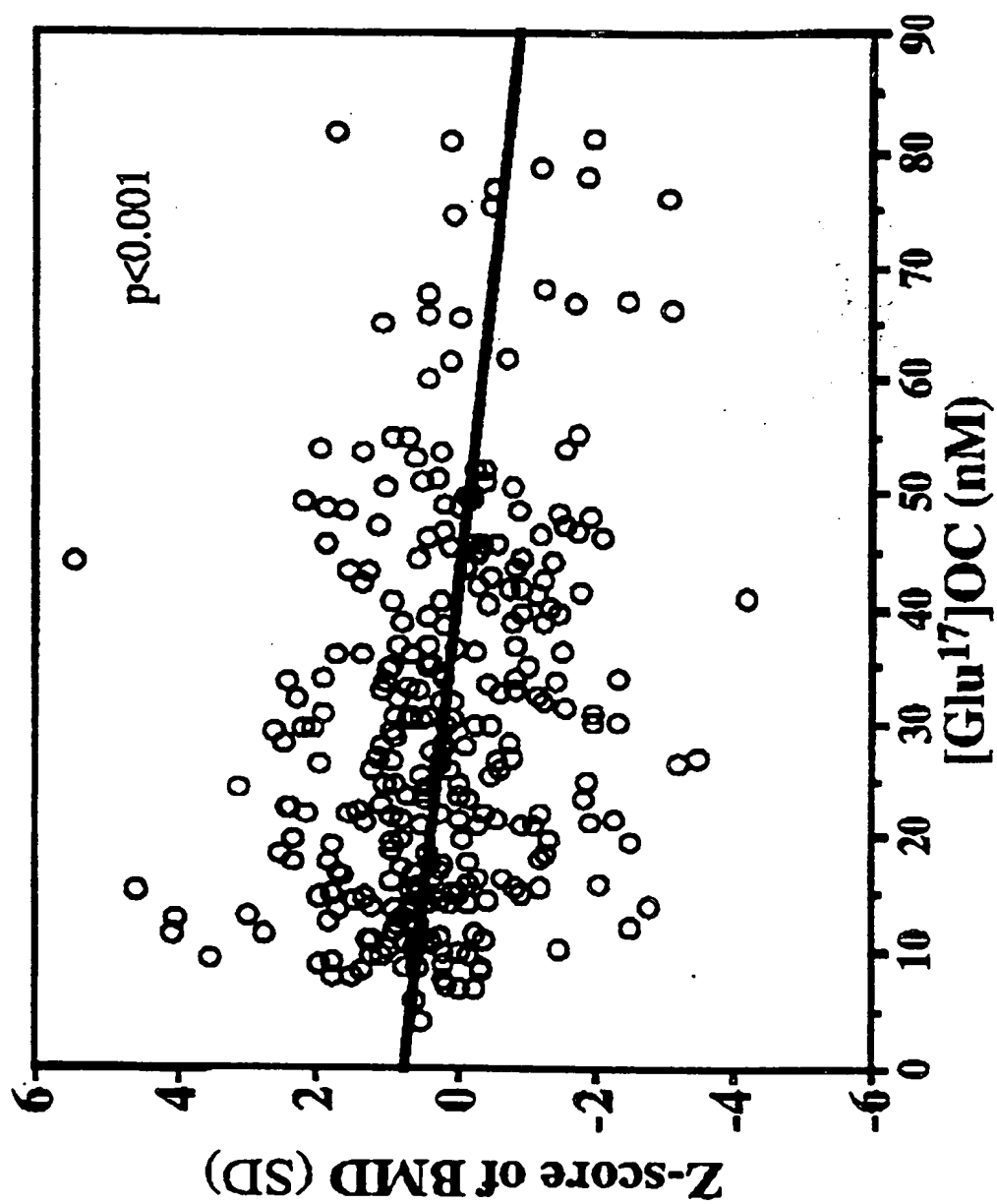
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 2



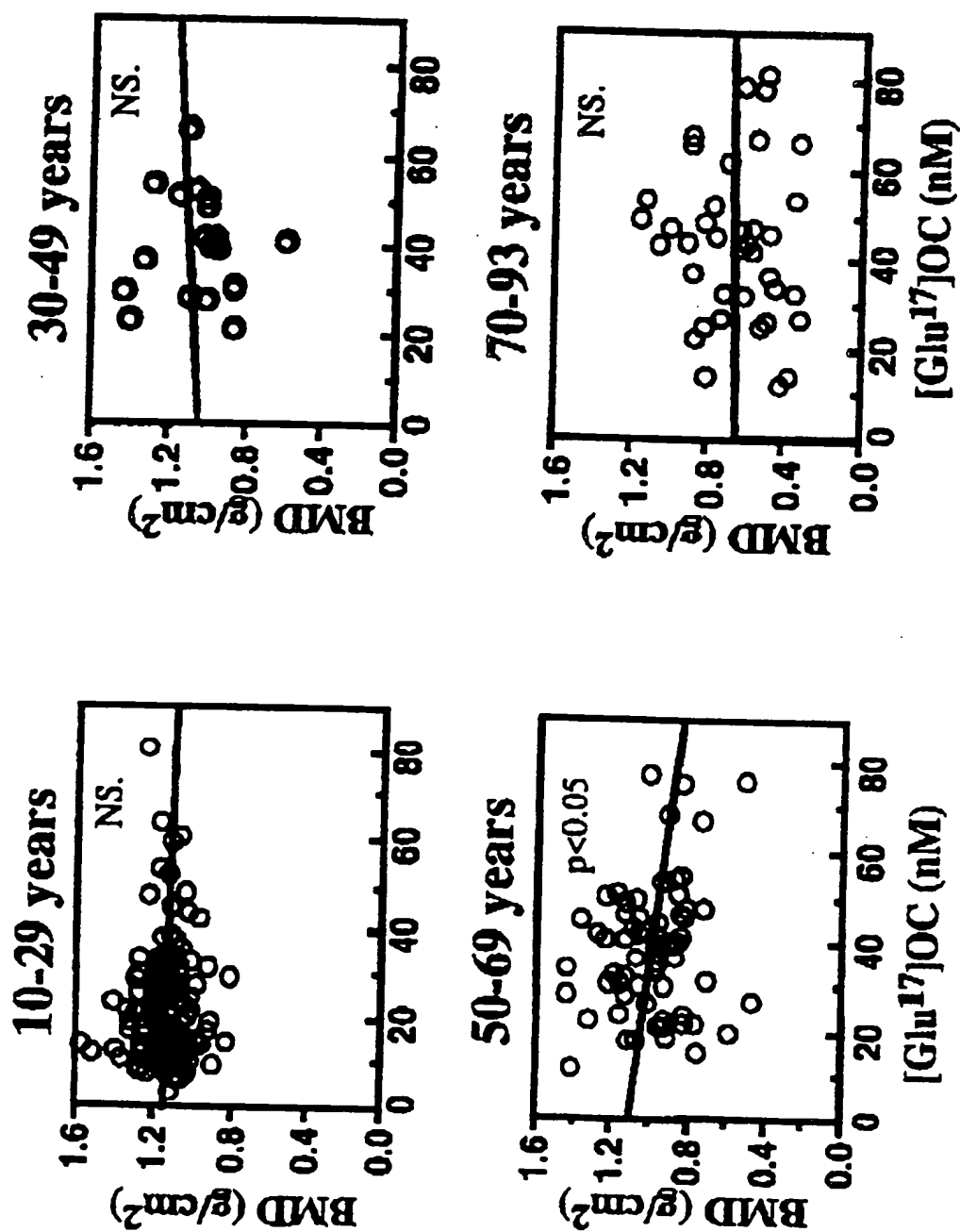
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/01246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1940 - 1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971 - 1996
Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994 - 1997

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Peptide Research Vol. 7, No. 4 (1994) H. Nakao et al., p. 171-174	1-6, 8-11 7
X Y	JP, 3-90100, A (Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd.), April 16, 1991 (16. 04. 91), Pages 1, 2; example 2 & EP, 418617, A1 & US, 5164483, A & US, 5258545, A	1-6, 8-11 7
X Y	JP, 5-32697, A (Teijin Ltd.), February 9, 1993 (09. 02. 93), Claim (Family: none)	1-6, 8-11 7
Y	JP, 60-500684, A (Commonwealth Serum Laboratories Commission), May 9, 1985 (09. 05. 85), Claim & WO, 84/03564, A1 & EP, 138855, A1 & US, 5595915, A	7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

May 8, 1997 (08. 05. 97)

Date of mailing of the international search report

May 27, 1997 (27. 05. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ G01N33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-1996年

日本国登録実用新案公報 1994-1997年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Peptide Research Vol. 7, No. 4 (1994) H. Nakao et al, p. 171-174	1-6, 8-11 7
X Y	JP, 3-90100, A (三菱油化株式会社), 16. 4月. 1991 (16. 04. 91), 第1-2頁, 実施例2&EP, 418617, A1&US, 5164483, A&US, 5258545, A	1-6, 8-11 7
X Y	JP, 5-32697, A (帝人株式会社), 9. 2月. 1993 (09. 02. 93) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-6, 8-11 7
Y	JP, 60-500684, A (コモンウェルズ セラム ラボラトリーズ コミッ ション), 9. 5月. 1985 (09. 05. 85) 特許請求の範囲&WO, 84/ 03564, A1&EP, 138855, A1&US, 5595915, A	7

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 05. 97

国際調査報告の発送日

27.05.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2J

9217

THIS PAGE BLANK (USPTO)